Cryptogamie, Mycol., 1989, 10 (1): 33-40

ALCALOÏDES DU GROUPE DE L'ERGOCLAVINE ÉLABORÉS PAR DES MOISISSURES

par C. MOREAU*

*Laboratoire de Microbiologie Appliquée.
Faculté des Sciences et Techniques. 29287 Brest Cedex.

RÉSUMÉ - Quelques moisissures sont aptes à élaborer des dérivés de l'ergoclavine; on connaît surtout: l'*Aspergillus fumigatus* qui produit: agroclavine, élymoclavine, chanoclavine I, fumigaclavines A, B et C, festuclavine, et le *Penicillium roqueforti* qui synthétise: festuclavine, roquefortine A et son stéréoisomère isofumigaclavine A, roquefortine B, roquefortine C. L'histoire de ces découvertes, la structure chimique de ces composés, les symptômes d'intoxications qu'ils induisent sont brièvement analysés.

ABSTRACT - Some moulds are able to elaborate ergoclavine derivatives. The well known are: *Aspergillus fumigatus* producing: agroclavine, elymoclavine, chanoclavine I, fumigaclavines A, B and C, festuclavine, and *Penicillium roqueforti* synthetizing: festuclavine, roquefortine A and its stereoisomer isofumigaclavine A, roquefortine B, roquefortine C. The history of these discoveries, the chemical structure of these compounds, the poisoning symptoms induced by these substances are briefly reported.

MOTS CLÉS : alcaloïdes, *Aspergillus fumigatus*, ergoclavine, mycotoxines, *Penicillium roqueforti*.

Les intoxications consécutives à l'ingestion des ergots, sclérotes de *Claviceps* développés dans les ovaires du seigle et de diverses Graminées, sont bien connues; elles ont laissé un souvenir terrifiant au Moyen-Age et au cours des siècles suivants. La mise au point de Bové (1970) en rapporte le récit détaillé.

Mais on sait maintenant que certaines moisissures sont également aptes à synthétiser des dérivés de l'ergoclavine, alcaloïdes semblables à ceux de l'ergot du seigle; les effets qu'ils engendrent sont des mycotoxicoses *sensu stricto* puisqu'ils peuvent être provoqués par "des métabolites toxiques élaborés par des moisissures développées sur des aliments" (Moreau, 1979a).

ALCALOÏDES DE L' *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

L' *Aspergillus fumigatus* Fres. est une moisissure réputée depuis fort longtemps en raison des mycoses, surtout des aspergilloses pulmonaires, qu'il provo-

que chez les oiseaux mais aussi parfois chez les mammifères (Marsh & al., 1979).

Moins connus sont sans doute les divers méfaits qu'ils peut causer au niveau du système nerveux. Il est en effet capable de se développer sur des substrats fort variés, en particulier sur des denrées (farines, ensilages, tourteaux, etc.) destinées à l'alimentation humaine ou animale. La consommation de ces aliments peut alors entraîner des troubles graves.

Ceni & Besta avaient établi dès 1902 un rapport entre l'absorption d'aliments moisis par l' *A. fumigatus* et l'injection d'extraits de spores et mycélium à des animaux par voie péritonéale, sous-cutanée ou veineuse: dans tous les cas, on aboutissait à la mort "après des spasmes, des convulsions tétaniques et épileptiques". Ces expérimentations, reprises par Henrici (1939), fournissent les mêmes conclusions.

Quelques années plus tard, dans un article paru aux *Annales de l'Institut Pasteur* intitulé "Note sur une toxine produite par l' *A. fumigatus*", Bodin & Gauthier (1906) ont rapporté chez les animaux "l'apparition de symptômes convulsifs, tétaniques et paralytiques entraînant la mort en quelques heures". Sans nul doute s'agissait-il là, sans que le terme ait été avancé, de l'action d'une mycotoxine neurotoxique.

Concernant l'homme, il a fallu attendre les travaux de Turesson (1916): cet auteur reconnaît que l'accumulation fortuite de spores de cette moisissure dans le tube digestif est particulièrement dangereuse; elle provoque des "convulsions musculaires ressemblant au tétanos, un affaiblissement et une paralysie souvent suivie de mort".

Au cours des récentes années, de nombreuses intoxications avec effets neurotropes liés à l' *A. fumigatus* ont été signalées chez diverses espèces animales au Japon (Yamazaki & al., 1971), chez des bovins aux États-Unis (Dorner & al., 1984; Di Menna & al., 1986), chez des moutons et des bovins en Angleterre (Mantle & al., 1978). De telles intoxications ont été maintes fois observées dans les élevages de diverses régions de France (Lafon, 1963; Moreau, 1973, 1974, 1979b, 1982) chez des veaux, des vaches laitières, des taurillons, des porcelets, des porcs charcutiers, des dindes, des canards de Barbarie, des lapins, des chiens.

Dans ces multiples exemples, les neurotoxines responsables n'ont pas été isolées. Il s'agit d'ailleurs vraisemblablement de l'action conjuguée de plusieurs substances.

En effet, on sait maintenant que l' *A. fumigatus* est capable d'élaborer plusieurs mycotoxines neurotoxiques dont la structure chimique relève qu'elles font toutes intervenir le tryptophane comme précurseur de leur biosynthèse (Bu'lock, 1980):

- les unes appartiennent aux mycotoxines à effets trémorgéniques (provoquant des tremblements prolongés (Moreau, 1988)): fumitrémorgines A, B, C, verruculogène, tryptoquivaline, tryptoquivalone, etc.

- les autres sont des alcaloïdes du groupe de l'ergoclavine.

Spilsbury & Wilkinson (1961), Yamano & al. (1962) et, plus récemment, Narayan & Rao (1982) ont ainsi mis en évidence dans des cultures de certaines

Fig. 1 - Formules chimiques de l'agroclavine (a), de l'élymoclavine (b), de la fumigaclavine A (= roquefortine A de Ohomomo) (c), de la festuclavine (d) et de la roquefortine de Scott (e).

Fig. 1 - Chemical formulae of agroclavine (a), elymoclavine (b), fumigaclavine A (= roquefortine A of Ohomomo) (c), festuclavine (d) and roquefortine of Scott (e).

souches d' *A. fumigatus*, divers alcaloïdes dont plusieurs dérivent les uns des autres: agroclavine (Fig. 1a), élymoclavine (Fig. 1b), chanoclavine I (= sécaclavine), fumigaclavines A (Fig. 1c), B et C, festuclavines (Fig. 1d). Ces substances, étudiées par Cole & al. (1977) sont essentiellement constituées d'une molécule acide lysergique combinée à des structures aminées variées: leur hydrolyse libère de l'acide lysergique et un ou plusieurs peptides.

En intoxications aiguës, on constate surtout une action psychotrope se manifestant par des vertiges, des hallucinations, un état hystérique, de l'ataxie et des périodes de rigidité tétanique. Dans les intoxications chroniques, on note des contractions brusques des muscles périphériques liées à une excitation des fibres lisses, une nécrose des extrémités avec développement d'une gangrène sèche (Joly, 1976; Cole & al., 1977).

L'hypothèse a été émise (Moreau, 1982) qu'une partie au moins des symptômes constatés lors de l'intoxicatin collective provoquée en août 1951 par la consommation de pain à Pont-Saint-Esprit (Gard) pourrait être liée au développement fortuit de l' *A. fumigatus* dans quelques sacs de farine ayant servi à la préparation du "pain maudit".

ALCALOÏDES DU *PENICILLIUM ROQUEFORTI*

Le *Penicillium roqueforti* Thom est la célèbre "moisissure verte" des fromages à pâte persillée. Il est également apte à se développer dans des ensilages (Graminées herbagères ou grains humides, pulpe de betterave, etc.) destinés à l'alimentation du bétail (Moreau, 1980).

Dès 1956, le *P. roqueforti* avait, au Japon, été rendu responsable de la mort brutale d'animaux ayant consommé des grains ensilés moisis (Tsubaki, 1976).

Plusieurs mycotoxines ont été isolées, en laboratoire, à partir de cultures de *P. roqueforti* placées dans des conditions bien précises. Les plus connues d'entre elles sont la PR toxine (Wei & al., 1973, 1975) et d'autres sesquiterpénoïdes dérivés de l'érémophilane (Moreau S. & al., 1976): ces composés induisent des altérations histologiques du foie et des reins ainsi que des hémorragies.

En 1958, Taber & Vining avaient soupçonné en outre l'élaboration d'alcaloïdes proches de ceux de l'ergot. Des travaux plus récents ont confirmé cette hypothèse.

C'est seulement en 1975 que Ohmomo & al. mirent en évidence divers composés:

- l'un, bien connu, la festuclavine $C_{16}H_{20}N_2$ (6,8-diméthylergoline) (Fig. 1 d),

- deux autres qu'ils purent caractériser et nommèrent:
roquefortine A $C_{18}H_{22}N_2O_2$ (7-acétoxy-6,9-diméthylergoline) (Fig. 1 c),
roquefortine B $C_{16}H_{20}N_2$ (6,9-diméthylergoline-7 ol),

- un quatrième, la roquefortine C dont ils ne purent préciser la structure (Ohmomo & al., 1977).

L'année suivante, Scott & al. (1976) isolèrent deux composés azotés d'une culture de 2 semaines de *P. roqueforti* sur milieu au saccharose et extrait de levures:

- le plus abondant, appelé roquefortine $C_{22}H_{23}N_5O_2$ (Fig. 1 e),

- l'autre étant l'isofumigaclavine A $C_{18}H_{22}N_2O_2$ (9,acétoxy-6,8-diméthylergoline) et qui, par hydrolyse, donne l'isofumigaclavine B $C_{16}H_{20}N_2O$ (6,8-diméthylergoline-9 ol) (Scott & Kennedy, 1976).

Il a été montré (Sieber, 1978) que la "roquefortine" de Scott n'était autre que la "roquefortine C" de Ohmomo. D'autre part, l'isofumigaclavine A est un simple stéréoisomère de la roquefortine A.

La configuration de ces divers composés a été récemment confirmée (Scott & al., 1979).

Ces alcaloïdes ont été trouvés dans 16 échantillons (sur 16 examinés) de fromages Gorgonzola, Stilton, bleu danois, bleu finnois dans une proportion variant de 0,06 à 6,8mg/kg pour la roquefortine, atteignant 4,7mg/kg pour l'isofumigaclavine A et à l'état de traces pour l'isofumigaclavine B. Les roquefortines sont surtout élaborées à 25°C, les isofumigaclavines à 15°C (Scott & al., 1976, 1977). Ces métabolites migrent peu dans la pâte du fromage et on les détecte surtout au voisinage des parties riches en moisissures (Scott & Kennedy, 1976).

La roquefortine est présente dans la plupart des souches de *P. roqueforti* utilisées en Allemagne pour la préparation des fromages à pâte persillée (Engel & Teuber, 1978; Orth, 1981). Il n'y a cependant pratiquement pas de risque pour le consommateur parce que la toxicité de la roquefortine est faible.

La roquefortine n'est pas métabolisée dans le foie du rat, mais elle est largement transformée pendant son excrétion par la bile (Mantle, 1986). On peut la considérer comme un peptide dérivé du tryptophane et de l'histidine. Elle serait un précurseur dans la biosynthèse de l'oxaline $C_{24}H_{25}N_5O_4$ dans les cultures de *P. oxalicum* Currie et Thom (Steyn & Vleggaar, 1983).

Le *P. commune* Thom (= *P. puberulum* Bain. selon Pitt (1979)), isolé de graines de cotonnier, est également apte à produire de la roquefortine et du penitrème A en mélange (Wagener & al., 1980).

On ignore si ce sont les mêmes substances qui ont été isolées par Abdel Kader et ses collaborateurs (1969) à partir d'un fromage persillé égyptien: des rats nourris pendant trois semaines avec une ration contenant 3,4% de cet extrait sont morts.

Il s'agit en tous cas là de composés essentiellement neurotoxiques (Moreau, 1980) provoquant à forte dose des convulsions et des paralysies chez les souris.

C'est encore le cas de trois autres alcaloïdes mineurs, les marcfortines A, B et C, récemment isolés du mycélium de *P. roqueforti* (Polonsky & al., 1980; Prange & al., 1981).

DIVERS

Signalons qu'une intoxication inhabituelle a été observée chez des êtres humains ayant consommé de la bière altérée par le *P. crustosum* Thom. On sait que, cultivé au laboratoire, ce champignon est capable de produire les mêmes alcaloïdes dérivés de l'ergoclavine que le *P. roqueforti*. Il n'a malheureusement pas été possible d'analyser la bière suspecte pour savoir si sa toxicité était liée à ces alcaloïdes (Cole & al., 1983).

Certaines souches de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Lind. peuvent élaborer de l'agroclavine, de l'ergosine et de l'ergosinine (El Refai & al., 1970b).

De même, on a pu suivre la biosynthèse d'agroclavine, d'élymoclavine, d'acide lysergique et d'ergosine par le *Geotrichum candidum* Link (El Refai & al., 1970b).

BIBLIOGRAPHIE

ABDEL KADER M.M., ZAKI A.H., EL-KIRDASSY Z.M.M., EL-KAMMAH B. and BOISSELLA A.A., 1969 - An aspect on the nutritive value of Roquefort cheese. *J. Egypt. Med. Assoc.* 52: 764-774.

BOIDIN E. et GAUTHIER L., 1906 - Note sur une toxine produite par l' *Aspergillus fumigatus. Ann. Inst. Pasteur* 20: 209.

BOVÉ F.J., 1970 - *The story of ergot.* Bâle, S. Karger, 297 p.

BU'LOCK J.D., 1980 - Mycotoxins as secondary metabolites. *In.* STEYN P.S., *The biosynthesis of mycotoxins.* N.Y. et London, Academic Press, 1-16.

CENI C. und BESTA C., 1902 - Ueber die Toxine von *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus flavescens* und deren Beziehungen zu Pellagra. *Centralbl. Allg. Pathol. Anat.*: 930.

COLE R.J., KIRKSEY J.W., DORNER J.W., WILSON D.M., JOHNSON J.C., BEDELL D.M., SPRINGER J.P., CHEXAL K.K., CLARDY J.C. and COX R.M., 1977 - Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from mouldy silage. *J. Agric. Food Chem.* 25: 826-830 and *Ann. Nutr. (Paris)* 31: 685-692.

COLE R.J., DORNER J.W., COW R.H. and RAYMOND L.W., 1983 - Two classes of alkaloid mycotoxins produced by *Penicillium crustosum* Thom isolated from contaminated beer. *J. Agric. Food Chem.* 31: 655-657.

DI MENNA M.E., LAUREN O.R. and WYATT P.A., 1986 - Effect of culture conditions on tremorgen production by some *Penicillium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 821-824.

DORNER J.W., COLE R.J. and HILL R.A., 1984 - Tremorgenic mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium crustosum* isolated from molded corn implicated in a natural intoxication of cattle. *J. Agric. Food Chem.* 32: 411-413.

EL-REFAI A.M., SALLAM L.A.R. and NAIM N., 1970a - The alkaloids of fungi. I. The formation of ergoline alkaloids by representative mold fungi. *Jap. J. Microbiol.* 14: 91-97.

EL REFAI A.M., SALLAM L.A.R. and NAIM N., 1970b - The alkaloids of fungi. 5. Studies of the biosynthesis of alkaloids in *Geotrichum candidum*. *Pakistan J. Biochem.* 3: 8-13.

ENGEL G. and TEUBER M., 1978 - Simple aid for the identification of *Penicillium roqueforti* Thom. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 107-111.

HENRICI A.T., 1939 - An endotoxin from *Aspergillus fumigatus*. *J. Immunol.* 36: 319-338.

JOLY P., 1976 - Les champignons vénéneux. *Rev. Mycol. (Paris)*: 185-206.

LAFON M., 1963 - Les intoxications fongiques chez le porc. *Bull. Mayenne Sci.*: 20-23.

MANTLE P.G., DAY J.B., HAIGH C.R. and PENNY R.H.C., 1978 - Tremorgenic mycotoxins and incoordination syndroms. *Veterin. Rec.* 103: 403.

MANTLE P.G., 1986 - Metabolism and elimination of tremorgenic mycotoxins. *In:* STEYN P.S. & VLEGGAAR R., *Mycotoxins and phycotoxins.* Amsterdam, Elsevier: 399-408.

MARSH P.B., MILNER P.D. and KLA J.M., 1979 - A guide to the recent literature on aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus*, a fungus frequently found in self-heating organic matter. *Mycopathologia* 69: 67-81.

MOREAU C., 1973 - Danger de l'ensilage d'artichauts pour l'alimentation animale. *Bull. Soc. Mycol. France* 89: 277-282.

MOREAU C., 1974 - Quelques manifestations de mycotoxicoses nouvelles ou peu connues en France. *Recueil Méd. Vét. (Alfort)* 150: 17-26.

MOREAU C., 1979a - *Moulds, toxins and food.* Chichester, John Wiley and Sons, 477 p.

MOREAU C., 1979b - Troubles nerveux et digestifs liés à la consommation par les animaux, d'aliments contaminés par des *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. *Rev. Mycol. (Paris)* 43: 227-238.

MOREAU C., 1980 - Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. *Le Lait* 60: 254-271.

MOREAU C., 1982 - Les mycotoxines neurotropes de l' *Aspergillus fumigatus*. Une hypothèse sur le "pain maudit" de Pont-Saint-Esprit. *Bull. Soc. Mycol. France* 48: 261-273.

MOREAU C., 1988 - Les mycotoxines à effets trémorgéniques. *Bull. Inst. Pasteur* (sous presse).

MOREAU S., GAUDEMER A., LABLACHE-COMBIER A. et BIGUET J., 1976 - Métabolites de *Penicillium roqueforti*. PR toxine et métabolites associés. *Tetrahedron Lett.* 32: 833-834.

NARAYAN V. and RAO K.K., 1982 - Production of ergot alkaloids by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14: 55-58.

OHMOMO S., SATO T., UDAGAWA T. and ABE M., 1975 - Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.* 39: 1333-1334.

OHMOMO S., UDAGAWA T. and ABE M., 1977 - Identification of roquefortine C produced by *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.* 41: 2097.

ORTH R., 1981 - Mykotoxine von Pilzen der Käseherstellung. *In*: REISS J., *Mykotoxine in Lebensmitteln*. Berlin, Gustav Fischer: 273-296.

PITT J.I., 1979 - *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. N.Y. et London, Academic Press, 634p.

POLONSKY J., MERRIEN M.A., PRANGE T., PASCARD C. and MOREAU S., 1980 - Isolation and structure (X ray analysis) of marcfortine A, [redacted] new alkaloid from *Penicillium roqueforti*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 601-602.

PRANGE T., BILLION M.A., VUILHORGNE M., PASCARD C., POLONSKY J. and MOREAU S., 1981 - Structure of marcfortine B and C (X ray analysis), alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *Tetrahedron Lett.* 22: 1977-1980.

SCOTT P.M. and KENNEDY B.P.C., 1976 - Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *J. Agric. Food Chem.* 24: 865-868.

SCOTT P.M., MERRIEN M.A. and POLONSKY J., 1976 - Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*. *Experientia* 32: 140-142.

SCOTT P.M., KENNEDY B.P.C., HARWIG J. and BLANCHFIELD B.J., 1977 - Study of conditions for production of roquefortine and other metabolites of *Penicillium roqueforti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 249-253.

SCOTT P.M., POLONSKY J. and MERRIEN M.A., 1979 - Configuration of the 3,12-double-bond of roquefortine. *J. Agric. Food Chem.* 27: 201-202.

SIEBER R., 1978 - Zur Frage der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von in der Kasefabrikation verwendeten Schimmelpilzkukturen. *Z. Ernahrungwiss.* 17: 112-123.

SPILSBURY J.F. and WILKINSON S., 1961 - The isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus* Fres. *J. Chem. Soc.*: 2085-2091.

STEYN P.S. and VLEGGAAR R., 1983 - Roquefortine, an intermediate in the biosynthesis of oxaline in cultures of *Penicillium oxalicum*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*. 560-561.

TABER W.A. and VINING L.C., 1958 - The influence of certain factors on the *in vitro* production of ergot alkaloids by *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. *Canad. J. Microbiol.* 4: 611-626.

TSUBAKI K., 1976 - *Penicillium* isolated from toxin ensilage. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 1: 6-7.

TURESSON G., 1916 - The presence and significance of moulds in the alimentary canal of man and higher animals. *Svensk Bot. Tidskr.* 10: 1-27.

WAGENER R.E., DAVIS N.D. and DIENER U.L., 1980 - Penitrem A and roquefortine production by *Penicillium commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 882-887.

WEI R.D., STILL P.E., SMALLEY E.B., SCHNOES H.K. and STRONG F.M., 1973 - Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Appl. Microbiol.* 25: 111.

WEI R.D., SCHNOES H.K., HART P.A. and STRONG F.M., 1975 - The structure of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Tetrahedron Lett.* 31: 109-114.

YAMANO T., KISHINO K., YAMATODANI S. and ABE M., 1962 - Investigation of ergot alkaloids found in cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Takeda Kenkyusho Nempo* 21: 95-101.

YAMAZAKI M., SUZUKI S. and MIYAKI K., 1971 - Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus* Fres. *Chem. Pharm. Bull.* 19: 1739-1740.